

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-72883

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)3月28日

C 12 N 15/12
C 07 K 13/00
// C 12 P 21/02

ZNA

H

8619-4H
8214-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全11頁)

⑮ 発明の名称 肝実質細胞増殖因子及びそれをコードする遺伝子

⑯ 特 願 平1-209449

⑰ 出 願 平1(1989)8月11日

⑱ 発 明 者 喜 多 村 直 実 大阪府守口市八雲東町2丁目272番地

⑱ 発 明 者 宮 澤 恵 二 大阪府枚方市香里園町6番13号

⑱ 発 明 者 大 工 原 恭 鹿児島県鹿児島市明和4丁目14番10-41

⑱ 発 明 者 坪 内 博 仁 鹿児島県鹿児島市原良町1925

⑱ 発 明 者 仲 大 地 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑱ 発 明 者 高 橋 和 展 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑲ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑳ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1 発明の名称

肝実質細胞増殖因子及びそれをコードする遺伝子

2 特許請求の範囲

(1) 第1図のアミノ酸配列で表されることを特徴とする肝実質細胞増殖因子。

(2) 第1図のアミノ酸配列のうち30番目のグルタミン酸から728番目のセリンまでの配列で表されることを特徴とする肝実質細胞増殖因子。

(3) 第1図のアミノ酸配列のうち32番目のグルタミン酸から728番目のセリンまでの配列で表されることを特徴とする肝実質細胞増殖因子。

(4) 第1図のアミノ酸配列で表される肝実質細胞増殖因子をコードすることを特徴とする遺伝子。

(5) 第1図のアミノ酸配列のうち30番目のグルタミン酸から728番目のセリンまでの配列で表される肝実質細胞増殖因子をコードすることを特徴とする遺伝子。

(6) 第1図のアミノ酸配列のうち32番目のグルタミン酸から728番目のセリンまでの配列で表される肝実質細胞増殖因子をコードすることを特徴とする遺伝子。

(7) 第2図の塩基配列で表される肝実質細胞増殖因子をコードすることを特徴とする遺伝子。

(8) 第2図の塩基配列のうち88番目のグアニンから2187番目のグアニンまでの配列で表される肝実質細胞増殖因子をコードすることを特徴とする遺伝子。

(9) 第2図の塩基配列のうち84番目のシトシンから2187番目のグアニンまでの配列で表される肝実質細胞増殖因子をコードすることを特徴とする遺伝子。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、遺伝子組換えによって得られた肝実質細胞増殖因子及びそれをコードする遺伝子に関する。

(従来の技術)

肝臓は、生体中で最も高度に分化の進んだ最大の器官である。これは主に各種栄養素(糖質、タンパク質、脂質、ビタミン、ホルモン等)の処理(代謝)、貯蔵、解毒、分解、排泄等の重要な多様な機能を兼ね備えており、なかでも生体内中間代謝の中心的な役割を果たすことが知られている。これらの機能を担っている肝実質細胞は生体内において各種のホルモンによる制御下に置かれ、ある場合にはきわめて旺盛な増殖を示す。例えば、ラットの肝臓のほぼ2/3を切除しても、約10日後には元の大きさに戻ることが知られており、ヒトでも肝臓患者等において、部分肝切除とその後の再生による治療が行われている。肝実質細胞の増殖による

肝再生の機構については従来より数多くの研究が行われ、肝実質細胞増殖因子の存在が報告されてきた。とりわけ、本発明者らの一部は、ヒト慢性肝炎患者血漿中には、肝実質細胞増殖活性が極めて高いことを見だし(Blood. Res., 6, 231(1985)及びExp. Cell. Res. 166, 139(1986))、その活性を有する因子を世界で初めて単一のタンパク質として精製することに成功した(特開昭63-22526号公報及びJ. Clin. Invest., 81, 414(1988))。

このヒト肝細胞増殖因子(以下「hHGF」と略す)は非還元条件下のSDS-PAGEによる推定分子量が約76000-92000であり、還元条件下のSDS-PAGEでは分子量58000-65000及び32000-35000の2つのバンドに分かれた。中村らは、ラット血小小板由来の同様な活性を有する因子を報告しており(Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1450(1984))、SDS-PAGEにより、その推定分子量は約27000であるとしていたが(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6489(1986))、その

後、単一のタンパク質として精製し、分子量69000と34000との2つのポリペプチドからなる分子量82000のタンパク質であると報告された(EBBS Letters, 224, 311(1987))。これらhHGF及びラットHGF以外には単一のタンパク質として精製された肝細胞増殖因子は今までに報告されていないし、hHGF及びラットHGFに関しても、その一次構造及び該因子のcDNAの塩基配列については、なんの報告もなされていない。

(発明の解決すべき問題点)

hHGFの生体における詳細な機能あるいは肝障害時における肝再生に対する効果等を生体外で調べるには、多量のhHGFを必要とするが、慢性肝炎患者血漿から多量のhHGFを精製することは人的、時間的、経済的に必ずしも容易ではなく、また感染源の存在する血漿中からhHGFのみを安定に取り出すことは困難を極める。かかる理由からhHGFの慢性肝炎患者血漿からの安定かつ大量の精製は行われていなか

った。

(問題点を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、hHGFを組換えDNA技術により大量に取得するべく種々検討した結果、かかる目的に有用なhHGFをコードする遺伝子を初めてクローニングすることに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の要旨は、第1図に示すアミノ酸配列で表される、シグナル配列を含むhHGF、第1図に示すアミノ酸配列のうち30番目のグルタミン酸残基(Glu)から最後のセリン残基(Ser)までの配列で表されるhHGF、第1図に示すアミノ酸配列のうち32番目のグルタミン(Gln)から最後のセリン残基(Ser)までの配列で表されるhHGF、該アミノ酸配列で表される各hHGFをコードする遺伝子、第2図に示す塩基配列で表される、シグナル配列を含むhHGFをコードする遺伝子、第2図に示す塩基配列のうち88番目のGから最後のGまでの配列で表される遺伝子及び第2図に示

す塩基配列のうち84番目のCから最後のQまでの配列で表される遺伝子に存する。

以下に本発明を説明するに、本発明のhHGPをコードする遺伝子(cDNA)は例えば第2図に示すような塩基配列を有する。なお、塩基配列は他の相等的な塩基配列を省略し1本鎖のみを記載した。この遺伝子より組換えDNA技術により例えば第1図に示すアミノ酸配列を有するhHGPを発現させることができる。この時、hHGPをコードするmRNAから翻訳される蛋白はシグナル配列を含んでいるが、細胞から分泌される場合にはシグナル配列が切断され、30番目のグルタミン残基(Glu)または32番目のグルタミン残基(Gln)以後のアミノ酸配列を有するhHGPが産生される。シグナル配列として、他の蛋白のシグナル配列を利用する事もできる。また、宿主細胞内にシグナル配列のない成熟hHGPを発現させる場合は、hHGPをコードする遺伝子として第2図に示す塩基配列のうち88番目のQまたは9

4番目のCから以後の塩基配列を有する遺伝子を用いる。ベクターのATGコドンにつなげて使用すればよい。さらに、本発明においては、肝実質細胞増殖促進活性を損なわない範囲内で、一部のアミノ酸または残基を除去、変更あるいは追加する等の改変を行ったものも本発明に含まれる。

本発明のhHGPをコードする遺伝子のDNA断片は例えば次の様な方法によって得られる。重症肝炎患者血漿より、例えばJ.Clin.Invest. 81,414(1988)に記載された方法によって精製されたhHGPは、還元条件下では、ジスルフィド結合が切断されて2本のポリペプチドに分かれる。分子量56000-65000のポリペプチドをH鎖、分子量32000-35000のポリペプチドをL鎖とする。hHGPを還元処理し生成したシステイン残基のチオール基をカルボキシメチル化したのち、逆相高速液体クロマトグラフィーでH鎖とL鎖を分離するか、あるいはhHGPを還元条件下で電気泳動し、そのゲルからH鎖、L鎖のそれ

ぞれを抽出したのち、例えばアブライド・バイオシステムズ社製気相プロテインシーケンサーで分析することにより、両鎖のアミノ末端アミノ酸配列を調べる事ができる。さらに、hHGP自体を、またはH鎖、L鎖分離後に、適切な蛋白分解酵素例えばアクロモバクテラプロテアーゼI(リジルエンドペプチダーゼ)で分解し、生成するペプチド断片を例えば逆相高速液体クロマトグラフィーで分離したのち、各ペプチドを上記と同様にしてアミノ酸配列分析すればポリペプチド内部のアミノ酸配列を知ることができる。これらのアミノ酸配列からDNA塩基配列を推定しオリゴヌクレオチドを作成しやすい配列を選定して、そのオリゴヌクレオチド、例えば、後述の実施例に示すようなオリゴヌクレオチドを合成してプローブとして使用する。hHGPをコードする遺伝子をスクリーニングするcDNAライブラリーとしては、人由来の肝臓cDNAライブラリー、脾臓cDNAライブラリー、胎盤cDNAライブラリー、等が利

用できる。これらのライブラリーはクローンテック社より販売されている。特に胎盤cDNAライブラリーが望ましい。その他hHGPを発現している細胞株、及び組織材料から常法に従ってcDNAライブラリーを作成してもよい。このようなcDNAが組み込まれたλファージをManiatisらの方法(「モレキュラークロニング」、コールドスプリングハーバーラボラトリー、58頁-73頁(1982))により大腸菌に感染させ培養する。形成されたプラークをhHGPの一部のアミノ酸配列から推定される塩基配列から作成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてプラークハイブリダイゼーション法(「モレキュラークロニング」、コールドスプリングハーバーラボラトリー、320頁-328頁(1982))に従って選定することにより、容易に目的とするhHGPのアミノ酸配列の一部と同じアミノ酸配列を有しなおかつhHGPのアミノ酸配列のプローブ以外の領域に相当する塩基配列をも有する、異なるλフ

ファージクローンをいくつか得ることができる。さらに上記スクリーニング陽性のブランクから Hanania らの方法（「モレキュラー・クロニング」、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー、78頁-79頁（1982））によりファージを増殖させ、そのものからグリセロールグラデーション法にしたがってDNAを精製し適切な制限酵素例えば *EcoRI* 等で切断後、*pUC18*、*pUC19* 等のプラスミドベクターあるいは *M13mp18*、*M13mp19* などの一本鎖ファージベクターに cDNA をサブクロニングし、Sanger らのジデオキシ法（ブローディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エー（*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*）74:5483（1977））に従って目的 cDNA セグメントの塩基配列を決定することができる。得られたクローンの塩基配列を解析しそれらを統合することにより（第3図）hHGPの一部をコードする cDNA クローン例によって、第1図に示

す hHGP の全アミノ酸配列の全てに対応する遺伝子を得ることができる。かくして得られる cDNA の発現は、例えば、該 DNA 断片をその塩基配列の順番が hHGP のアミノ酸配列に従う形でつないでそれら hHGP の全領域を含む DNA 断片としこれを *pCDL-SRα288* 等のプラスミドのプロモーターの下流に翻訳開始コドン ATG とフェーズを合わせて接続して蛋白質発現用プラスミドを形成し、該プラスミドで形質転換された動物細胞の宿主内等で行うことができる。次いで、常法に従い発現された蛋白質を回収することにより本発明の HGP を得ることができる。

上記発現用プラスミドとしては、工業的生産のためには、安定した宿主ベクター系を得ることが望ましい。例えば、特開平1-18831号に記載されているようなものが挙げられる。具体的には、大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときは、プロモーター、リボゾーム結合配列、hHGP 遺伝子、転写終結因子、及びプ

ロモーターを制御する遺伝子より成ることが好ましい。プロモーターとしては、例えばトリプトファン合成酵素オペロン（*trp*）、ラクテースオペロン（*lac*）、リボプロテインのプロモーター（*lpp*）等が挙げられ、また、*tac*（*trp:lac*）、*trc*（*trp:lac*）、*pac*（ファージ：大腸菌）等のハイブリッドプロモーターでもよい。hHGP 遺伝子としてはシグナル配列に相当する部分を除去したものが好ましいが、シグナル配列に相当する部分を含むものでも産生されるプレ体からシグナル配列を除くことによって hHGP を得ることが出来る。使用するプラスミドとしては、大腸菌や枯草菌で多コピー数になるプラスミド、例えば *pBR322* 系プラスミド、*pUB110* 系プラスミド等が望ましい。通常の方法により形質転換された大腸菌、枯草菌などは、通常の培地を用いて 15-42℃ で培養すればよい。酵母を宿主とする場合は、酵母由来のプロモーター、例えばビール酵母キナーゼ（*pYK*）、

ホスホグリセロキナーゼ（*pGK*）等の配列の支配下に hHGP 遺伝子を接続し、酵母内に導入して 30℃ 前後で培養すればよい。しかしながら、天然の hHGP は糖蛋白であることを考慮すると、宿主としては動物細胞が望ましい。また、動物細胞を宿主とする場合はシグナル配列に相当する部分を含む hHGP 遺伝子を導入することにより、シグナル配列が除かれた hHGP が分泌生産されるという利点が期待される。シグナル配列としては hHGP の本来のシグナル配列以外にもヒト血液アルブミン、インターフェロン、ヒト・アミラーゼ等のシグナル配列を利用してもよく、その場合は本来のシグナル配列をコードする DNA 断片にかえて、それらのシグナル配列に相当する塩基配列の DNA 断片を 5' 側に置換すればよい。動物細胞を宿主とする場合、プロモーターとしては、*SV40* 後期プロモーター、アポリボプロテイン E 遺伝子のプロモーター、アポリボプロテイン A1 遺伝子のプロモーター、熱ショック蛋白遺

伝子のプロモーター、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター、HSV TKプロモーター、アデノウイルスのプロモーター、レトロウイルスのLTR等が挙げられるが、SV40プロモーター及びメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。発現ベクターには、hHGP遺伝子の下流にポリアダニル化部位が含まれる。ポリアダニル化部位の具体例としては、SV40 DNA、 β -グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子に由来するものが挙げられる。また、 β -グロビン遺伝子のポリアダニル化部位及びSV40 DNAのポリアダニル化部位が連結したものであってもよい。発現ベクターは、形質転換体の選択マーカーを有していてもよい。発現ベクター中に選択マーカーがなくとも、二重形質転換により、形質転換された動物細胞を選択できる。このような選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子、HAT培地中での形質転換もk⁻株の選択を可能とするヘルペス・シンプレックスウ

イルス(HSV)のtk遺伝子、S'-ゲオキシストレプタミシン抗生物質G418に対する耐性を付与する大腸菌のトランスポゾンTn5からのアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、重層増殖によるウシパピローマウイルス遺伝子、aprt遺伝子等が挙げられる。また、二重形質転換法により、発現ベクターで形質転換した動物細胞を選択するには、上記した選択マーカーとなる遺伝子を含有するプラスミドその他のDNAを発現ベクターと一緒に形質転換し、選択マーカーの発現による上記した表現形質により、形質転換細胞を選択出来る。発現ベクターは、大腸菌等の細菌由来の複製開始点を有するプラスミド断片を有すると、細菌中でのクローニングも可能となり有利である。このようなプラスミド断片としてはpBR322、pBR327、pML等のプラスミド断片が挙げられる。発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40初期プロモーター、ウサギの β -グロビン遺

伝子に由来するスプライス配列DNA、ウサギの β -グロビン遺伝子からのポリアダニル化部位、SV40初期領域からのポリアダニル化部位並びにpBR322からの複製開始点及びアンピシリン耐性遺伝子を含有するpKCR、pKCRのpBR322部分をpBR327で置換し、ウサギ β -グロビン遺伝子のエクソン3中に存在するEcoRI部位をHindIII部位に変えたpKCR H2、BPV遺伝子及びメタロチオネイン遺伝子を含有するpBPV MT1等が挙げられる。発現ベクターで形質転換される動物細胞としては、CHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスPM3A細胞等が挙げられる。発現ベクターの動物細胞への移入はトランスフェクション法、マイクロインジェクション法としては、リン酸カルシウム法が最も一般的である。移入により形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI164

0などが一般的である。

産生されたhHGPの分離精製は、劇症肝炎患者血液からの精製と同様に、ヘパリン・セファローズやハイドロキシアパタイト等を用いたカラムクロマトグラフィーにより行うことが出来る。

(発明の効果)

本発明に係わるhHGPをコードする遺伝子は常法により発現ベクターに導入することによって、これを鋳型とする発現によりhHGPまたはhHGP様物質あるいはこれを含む融合蛋白を得ることができる。得られる転換hHGP、hHGP様物質あるいはhHGPを含む融合蛋白は肝再生促進剤、肝臓病改善剤、肝炎治療剤あるいは肝硬変抑制剤等肝疾患の治療薬となる可能性がある。

(実施例)

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[1] hHGPの部分アミノ酸配列決定及びブロープの作成

重症肝炎患者血漿より、J.Clin.Invest., 81, 414 (1988)に記載された方法に従ってhHGPを精製した。これをSDS-PAGEにかけたところ、非還元条件下では、分子量76000-92000の位置にややブロードな単一バンドが現れ、還元条件下では、分子量56000-65000のややブロードなバンドと分子量32000-35000のバンドの2つのバンドが現れた。この精製hHGP 50 μ gを5モル濃度の尿素を含むpH 8の50ミリモル濃度のトリス塩酸緩衝液100 μ lに溶解し、これに、hHGPに対しモル比で1/200に相当するアクロモバクタープロテアーゼIを加えて37°Cで8時間反応させた。生成したペプチド混合物は常法により還元カルボキシメチル化したのち、J.T.Baker社製Bakerbond WP Octyl Columnを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離して、各ペプチドを分取した。

4つのペプチドについて気相プロテインシーケンサー (Applied Biosystems社 Model 470A) を用いてアミノ酸配列分析を行ったところ、表1に示すような配列が見いだされた。

番号	ペプチドのアミノ酸配列
1.	PhaLeuProGluArgTyrProAspLys
2.	GluPheGlyHisGluPheAspLeuTyrGluAspLys
3.	AspTyrGluAlaTrpLeuGlyIleHisAspValHis-GlyArgGlyAspXXILys
4.	AsnMetGluAspLeuHisArgHisIlePheTrpGlu-ProAspAlaSerLys

XXXは未決定のアミノ酸

[2] hHGPの一部をコードするcDNAのスクリーニング

(1) ブラックハイブリダイゼーション
スクリーニングを行うスファージcDNAライブラリーとして34週齢のヒト胎盤由来のcDNA (クローンテック社) のスクリーニングを説明書に従って行った。100万クロンの

ファージを大腸菌Y-1090株に感染させ24.5cm x 24.5cmのシャーレ中のNZY軟寒天培地 [NZY培地: 1% NZ-アミン、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、pH 7.5に調整し、0.25% 塩化マグネシウムを加えたもの、NZY軟寒天培地: NZY培地に0.7%になるように寒天液を加えオートクレイブしたもの] 中で1枚あたり20万クロンの割合で5枚分を42°Cで一晩培養した。次に培地中のスファージクロンを市販のナイロン膜であるジーンスクリーニングプラス (デュボン社) 上に移し取り、以下に説明するブラックハイブリダイゼーションを行った。即ち、1枚のシャーレあたりナイロン膜2枚の割合でファージ粒子を移し取り、その様にしてできたナイロン膜を0.1M水酸化ナトリウム-1.5M塩化ナトリウムが染み込んだろ紙上に2分間静置し別に用意した乾いたろ紙上で水分を除いた後、次に、同様にして2 x SSC (2倍の濃度のSSC溶液のこと、以下同様の表記方法をとる。10

x SSC: 1.2M塩化ナトリウム、150mMクエン酸ナトリウム、130mM磷酸二水素カリウム、1mMEDTA pH 7.2) - 0.2Mトリス-塩酸 (pH 7.4) を染み込ませたろ紙上でこのナイロン膜を静置し乾いたろ紙上で風乾した後、同じ操作を再び繰り返した。こうして処理したナイロン膜は、3 x SSC (20倍の濃度のSSC溶液: 3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム) - 0.1% SDSで60°Cで15分間2回洗浄し、次にナイロン膜1枚当たり5mlのプレハイブリダイゼーション液 [3 x SSC, 0.1% SDS, 10 x Denhaalt (50倍の濃度のDenhaalt溶液: 1% BSA (牛血清アルブミン) 1% ポリビニルピロリドン、及び1% フィコール400)、20 μ g/ml精子DNA] に65°Cで3時間浸した。次に、表1のペプチド4、すなわち Asn-Met-Glu-Asp-Leu-His-Arg-His-Ile-Phe-Trp-Glu-Pro-Asp-Ala-Ser-LysのうちのAsn-Met-Glu-Asp-Leu-HisおよびHis-Ile-Phe-Trp-Glu-Proを基に合成オリゴヌク

レオチドを作成した。即ち、前述のアミノ酸配列の順に17塩基84種類のTH23(5'-T-G-T/C/A/G-A-A/G-A/G-T-C-T/C-T-C-C-A-T-A/G-T-T-3')、17塩基24種類のTH24(5'-G-O-T/C-T-C-C-C-A-A/G-A-A-A/G-T-A-T-A/G-T-O-3')を作成した。これらを常法に従いポリヌクレオチドキナーゼによりその5'末端を反応液[50mMトリス-塩酸pH7.5、10mM塩化マグネシウム、10mMメルカプトエタノール、100μM[γ-³²P]ATP、高質DNA]中で³²P標識した後、常法に従いDEAEセルロースカラムをかけて余分なモノヌクレオチドを除いた。こうしてできあがった³²P標識合成オリゴヌクレオチドプローブを含むハイブリダイゼーション液[3XSSC、10xDenha1t、50μg/ml鮭精子DNA1M塩化ナトリウム、1%SDS、250μg/ml鮭精子DNA、合成プローブ1種類当り10万c.p.m./ml³²P標識プローブDNA]中で

前述のフィルターをブローブに反応しAまたはTを2℃に、GまたはCを4℃に置き換えて全ての塩基を合計した温度、實際はブローブにより42℃(TH23)48℃(TH24)で38時間保温した。その後、ナイロン膜を取り出し、4xSSC溶液中で室温で30分間2回洗い、4xSSC溶液中でハイブリダイゼーションの時と同じ温度で30分間2回洗った後2xSSC溶液中で室温で15分間2回洗い、オートラジオグラフィをとった。

2枚1組のナイロン膜のオートラジオグラフィ上のシグナルが一致したものは8個あった。得られたシグナルに相当するクローンを単離するために、これらシグナルと一致する感染天増殖上のプラークをガラス管で打ち抜き50μlのクロロフォルム存在下1mlのTMG緩衝液[50mMトリス-塩酸pH7.5、100mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウム及び0.01%ゼラチン]中でファージ粒子を一晩抽出し再び大腸菌Y-1090株に感

染させ9cmシャーレ中で適量増殖し前述の方法でプラークハイブリダイゼーションを行った。この一連の操作を繰り返すことによりシグナルに相当するクローンを各々単離することができた。その結果抽出した6個のクローンを得た。そのうち2個のクローン、すなわちλHGf21とλHGf502について、含まれるcDNAの塩基配列を解析した。

(2) cDNA断片のサブクローニング及び塩基配列の決定

これらのλファージクローンから以下のようにDNAを抽出しプラスミドベクターpUC18、pUC19及び一本鎖ファージベクターM13mp18、M13mp19にサブクローニングをおこなった。即ち、500ml三角フラスコ中の200mlのNZY増殖中において、200μlのTMG溶液中に懸濁してあるλファージクローン 2×10^8 p.f.u. (p.f.u.: プラーク形成単位)と40μlの大腸菌Y-1090株 2×10^8 を37℃15分置くことにより感染させた。15分後さ

らに1mlの1M塩化カルシウムを加え一晩、振ね14時間ほど培養した。次に、2mlのクロロフォルムを加え10分ほど置き、15.8gの塩化ナトリウムを加え溶かし、それらを4℃において日立冷却遠心機SCR20BBで、ローターRPR9-2を用いて8000回転20分間遠心した上清に20gのポリエチレングリコール8000を加えて十分に溶解した後に水中で1時間静置した。これを日立冷却遠心機SCR20BBで、ローターRPR9-2において8000回転20分間遠心し沈澱を5mlのA緩衝液[0.5%NP40、38mM塩化カルシウム、30mMトリス-塩酸pH7.5、50mM塩化マグネシウム、125mM塩化カリウム、0.5mMEDTA、0.25%デオキシコール酸、0.8mMメルカプトエタノール]に懸濁しここに100μlの10mg/mlのデオキシリボヌクレアーゼIと10μlの10mg/mlのリボヌクレアーゼAを加え30℃で30分間保温することにより大腸菌由来の膜を分解した。その後上清反応液

に等量のクロロホルムを加えよく攪はんしたのちにトミー遠心機L C-08、ローターTS-7で3000回転10分間遠心し上清を得た。一方予め日立超遠心機ローターRPS40T用遠心管に40%グリセロール溶液[0.5%NP40、30mMトリス-塩酸pH7.5、125mM塩化カリウム、0.5mMEDTA、0.6mMメルカプトエタノール、10%グリセロール]を1ml入れておきその上に3mlの10%グリセロール溶液[0.5%NP40、30mMトリス-塩酸pH7.5、125mM塩化カリウム、0.5mMEDTA、0.6mMメルカプトエタノール、40%グリセロール]を重ねて準備しておいた上に先ほどのスクレアゼ処理をしたファージ懸濁液を重ねし、日立超遠心機70P72、ローターRPS40Tで35000回転1時間遠心する。遠心後沈澱として落ちてきたファージ粒子を0.4mlの40mMトリス-塩酸pH7.5、10mMEDTA、2%SDSに懸濁し4μlの10mg/mlのプロテナーゼKを加えて55℃で1時間保温を行った。

その後溶液をエッペンドルフチューブに移し等量のフェノール/クロロホルムにてファージDNAを抽出しエタノール沈澱を行うことにより目的とするファージDNAを200μg得ることが出来た。このファージDNAを制限酵素EcoRIで常法に従い切断しアガロース電気泳動法にて解析した。その結果クロンλhGF21から0.2kbと0.85kbと0.72kbの3本のEcoRI断片を得た。一方アガロースゲルから該インサートcDNA断片を常法に従い回収することにより目的とするcDNA断片を得ることが出来た。これらcDNA断片100ngを予め常法に従い制限酵素EcoRIによって切断しておいたプラスミドベクターpUC18、pUC19及び一本鎖ファージベクターM13mp18、M13mp19 200ngと10μlの反応液[66mMトリス-塩酸pH7.8、6.6mM塩化マグネシウム、10mMジチオスレイトール、66μMATP、高質DNA]中でユニットのT4DNAリガーゼにより結合しそれ

ぞれのベクターに見合った宿主の大腸菌を常法に従い形質転換することによりEcoRI挿入部位にHGP蛋白質の部分配列を持つサブクロンを得た。

得られたcDNAサブクロンの塩基配列の決定は、Sangerらのジデオキシ法によって行った。プライマーは市販のM13ファージベクターに対応するものを使用した。その結果、最も長いcDNAを持つクロンλhGF21の塩基配列をアミノ酸に翻訳すると第3図に示すようにすでに明らかにされているアミノ酸配列のうちプロープの設計に使用したアミノ酸配列とは異なる領域のアミノ酸配列のうちのいくつかを含んでいることが判明し、このクロンがhHGFの少なくとも一部分の領域を含むcDNAであることが判明した。また、λhGF21にはないcDNA断片を含むクロンλhGF502のcDNAの塩基配列をSanger法に従い解析した結果、クロンλhGF502はクロンλhGF21と同じ塩基配列を第2図で示す制限酵素切断部位NcoIの

近傍から5'上流から数えて三番目のEcoRI切断部位の近傍までの0.8kbの長さで共有し3'側にλhGF21にはない0.7kbの塩基配列をもつことがわかった。λhGF502の塩基配列のうちλhGF21の有しない塩基配列のなかには既に解析されているアミノ酸配列に相当する塩基配列があることが判明した。これら2つのクロンの塩基配列を一部が重複する形でつなぎあわせるとhHGFのアミノ酸配列の全てをカバーすることが判明した。

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のhHGFのアミノ酸配列を表す。

第2図は、実施例1で得られた本発明のhHGFをコードする遺伝子を含むcDNAの塩基配列を表す。図中に主な制限酵素の認識部位を併記した。また下線はすでに明らかにされていたアミノ酸配列に対応する部分を示しそのうち二重下線は最初のクロンを得る際に使用したプロープに対応するアミノ酸配列を表す。

第一圖 (その1)

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala	10	Leu Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu	20
Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala	30	Gly Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile	40
Gln Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr	50	Leu Ile Lys Ile Asn Pro Ala Leu Lys Ile	60
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asn Gln	70	Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly	80
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe	90	Asn Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe	100
Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys	110	<u>Gln Phe Gly His Gly Phe Asn Lys Tyr</u>	120
<u>Asn Lys</u> Asn Tyr Ile Arg Asn Cys Ile	130	Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr	140
Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys	150	Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Gln	160
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly	170	Lys Asn Leu Gln Gln Asn Tyr Cys Arg Asn	180
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys	190	Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Gln	200
Cys Asn Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val	210	Gly Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr	220
Gly Leu Met Asn His Thr Glu Ser Gly	230	Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asn His Gln Thr	240
His Arg His Lys <u>Phe Lys Pro Gln Arg</u>	250	<u>Tyr Pro Asn Lys</u> Gly Phe Asn Asn Asn Tyr	260
Arg Asn Pro Asn Gly Gln Pro Arg Pro	270	Trp Cys Tyr Thr Leu Asn Pro His Thr Arg	280
Gln Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala	290	Asn Thr Met Asn Asn Thr Asn Val Pro	300
Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln	310	Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr	320
Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp	330	Asn Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asn Met	340
Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asn Leu	350	Arg Gln Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asn Gly	360

第一圖 (その2)

Gln Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asn	370	Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln	380
Pro Asn Cys Asn Met Ser His Gly Gln	390	Asn Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr	400
Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly	410	Leu Thr Cys Ser Met Trp Asn Lys <u>Asn Met Gly</u>	420
<u>Asn Lys His Arg His Ile Phe Trp Gly</u>	430	<u>Pro Asn Ala Ser Lys</u> Leu Asn Glu Asn Tyr	440
Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala His Gly	450	Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile	460
Trp Asn Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys	470	Glu Gly Asn Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu	480
Asn His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys	490	Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile	500
Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val	510	Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys	520
Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val	530	Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg	540
Leu Lys <u>Asn Tyr Gln Ala Trp Leu Gly</u>	550	<u>Ile His Asn Val His Gly Arg Gly Asn Gly</u>	560
Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln	570	Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asn Leu	580
Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val	590	Leu Asn Asn Phe Val Ser Thr Ile Asn Leu	600
Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys	610	Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr	620
Gly Leu Ile Asn Tyr Asn Gly Leu Leu	630	Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn	640
Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys	650	Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala	660
Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys	670	Glu Gly Asn Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys	680
Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly	690	Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile	700
Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val	710	Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile	720
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser			

第二圖 (その1)

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCG CTG CTG ⁸⁰
_{Pol I} CAG CAT GTC CTC CTG CAT CTC CTC
CTG CTC CCC ATC GCG ATC CCC TAT GCA CAG CGA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT ¹²⁰
GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA ¹⁶⁰
_{Eco RI} ACC AAA AAA GTG AAT ²⁰⁰
_{Pol I} GCA GAC CAA TGT GGT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT ²⁴⁰
CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA GCA AGA AAA CAA TGC CTC TGG TTC CCC ²⁸⁰
TTC AAT ACC ATG TCA AGT GCA GTG AAA AAA GAA TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA ³²⁰
AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC ATC ATT GGT AAA GGA GCG AGC TAC AAG GGA ACA GTA ³⁶⁰
TCT ATC ACT AAG AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC ⁴⁰⁰
AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT ⁴⁴⁰
_{Xho I} CGA GCG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC ⁴⁸⁰
TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA TGC ATG ACC TGC AAT GGG GAG AGT TAT CCA ⁵²⁰
GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA ⁵⁶⁰
CAC CGG CAC AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC ⁶⁰⁰

第二圖 (その2)

CGC AAT CCC GAT GGC CAG CCG AGG ⁸⁴⁰
_{Eco RI} CEA TGG TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC ACC CGC TGC
GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GCT GAC AAT ACT ATG AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTC ⁸⁸⁰
_{Sca I} GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA GGA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT ⁹²⁰
TGG AAT GGA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT CCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT ⁹⁶⁰
_{Eco RI} CCT GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA GAA AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GGG TCT ¹⁰⁰⁰
GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA AAC ATC CGA GTT GGC TAC TGC TCC CAA ATT ¹⁰⁴⁰
CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA GAT TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG ¹⁰⁸⁰
GGC AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA ACA TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA ¹¹²⁰
CAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA CAT GCA AGT AAG CTC AAT GAG AAT TAC TGC ¹¹⁶⁰
CGA AAT CCA GAT GAT GAT GCT CAT GGA CCC TGG TGC TAC ACG GGA AAT CCA CTC ATT CCT ¹²⁰⁰
TGG GAT TAT TGC CCT ATT TGT CGT TGT GAA GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA ¹²⁴⁰
GAC CAT CCC GTA ATA TCT TGT GGC AAA ACG AAA CAA TTG CGA GTT GTA AAT GGG ATT CCA ¹²⁸⁰
ACA CGA ACA AAC ATA GGA TGG ATG GTT AGT TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT ATC TGC GGA ¹³²⁰
GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT CGA GAC ¹³⁶⁰
_{Xho I}

第二圖 (その3)

~~TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG GTT GGA ATT CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA~~ 1880
~~1880~~
 TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTC GTT 1740
 TTA ATG AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG GAT GAT TTT GTT AGT ACC ATT GAT TTA CCT 1880
 AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC AGT TGC AGT GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT 1880
 GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CTA TTA CGA GTC GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG 1820
 AAA TGC AGC CAG CAT CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GCG 1880
 GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT GTT TGT GAG 2040
 CAA CAT AAA ATG ACA ATG GTT CTT GCT GTC ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA 2100
 AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT 2180
 TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG
 Kpn I

手続補正書 (自発)

平成1年8月8日

特許庁長官 吉田文毅殿

- 1 事件の表示 01-207441
平成1年8月11日提出の特許願(04)

- 2 発明の名称
肝実質細胞増殖因子及びそれをコードする遺伝子

- 3 補正をする者
出願人 (596) 三菱化成株式会社

- 4 代理人 〒100
住所 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
三菱化成株式会社内
TEL (283) 6976
氏名 (6906) 井理士 長谷川

(ほか1名)

- 5 補正の対象
明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6 補正の内容

明細書第20頁の表1を削除し、下記のよ
うに訂正する。

表1 ペプチドのアミノ酸配列

番号	配列
1.	PhoLeuProGluArgTyr- ProAspLys
2.	GluPheGlyHisGluPhe- AspLeuTyrGluAsnLys
3.	AspTyrGluAlaTrpLeu- GlyIleHisAspValHis- GlyArgGlyAspXXXLys
4.	AsnMetGluAspLeuHis- ArgHisIlePheTrpGlu- ProAspAla-SerLys
5.	ArgArgAsnThrIleHis- GluPheLys
6.	IleAspProAlaLeuLys XXXは未決定のアミノ酸

以上

